



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP 2004/008521

22. 6. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2 0 0 3 年 6 月 2 0 日

出 願 番 号

Application Number:

特 願 2 0 0 3 - 1 7 6 3 6 5

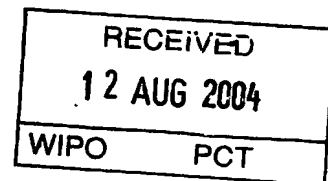
[ST. 10/C]:

[J P 2 0 0 3 - 1 7 6 3 6 5]

出 願 人

Applicant(s):

日 東 電 工 株 式 会 社

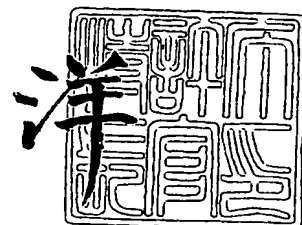


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 7 月 2 9 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 4 - 3 0 6 6 9 0 7



【書類名】 特許願
【整理番号】 P03263ND
【提出日】 平成15年 6月20日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12M 3/00

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県西宮市名塩南台 1 - 3 - 5

【氏名】 粟津 邦男

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市下穂積 1 丁目 1 番 2 号 日東電工株式会社
内

【氏名】 梅原 俊志

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市下穂積 1 丁目 1 番 2 号 日東電工株式会社
内

【氏名】 日野 敦司

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市下穂積 1 丁目 1 番 2 号 日東電工株式会社
内

【氏名】 赤田 祐三

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市下穂積 1 丁目 1 番 2 号 日東電工株式会社
内

【氏名】 福島 康裕

【特許出願人】

【識別番号】 000003964

【住所又は居所】 大阪府茨木市下穂積 1 丁目 1 番 2 号

【氏名又は名称】 日東電工株式会社



【代理人】

【識別番号】 100092266

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴木 崇生

【電話番号】 06-6838-0505

【選任した代理人】

【識別番号】 100104422

【弁理士】

【氏名又は名称】 梶崎 弘一

【電話番号】 06-6838-0505

【選任した代理人】

【識別番号】 100105717

【弁理士】

【氏名又は名称】 尾崎 雄三

【電話番号】 06-6838-0505

【選任した代理人】

【識別番号】 100104101

【弁理士】

【氏名又は名称】 谷口 俊彦

【電話番号】 06-6838-0505

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 074403

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9903185

【プルーフの要否】 要



【書類名】 明細書

【発明の名称】 細胞マイクロチップ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 プラスチック基板上にマイクロ流路を形成してなる細胞マイクロチップ。

【請求項 2】 前記マイクロ流路の断面が矩形、三角形、円、楕円またはそれらの切断形である請求項 1 に記載の細胞マイクロチップ。

【請求項 3】 前記マイクロ流路の断面の長辺および短辺または直径が $2 \sim 200 \mu\text{m}$ である請求項 2 に記載の細胞マイクロチップ。

【請求項 4】 前記マイクロ流路が 1 または複数の分岐点を有する請求項 1 ～ 3 いずれかに記載の細胞マイクロチップ。

【請求項 5】 前記分岐点が流路 (A)、流路 (B)、および流路 (C) によって構成される三叉路状分岐点である請求項 4 に記載の細胞マイクロチップ。

【請求項 6】 前記マイクロ流路が細胞を用いた 1 組の測定系を構成し、当該測定系が前記 1 枚のプラスチック基板上に複数形成されている請求項 1 ～ 5 いずれかに記載の細胞マイクロチップ。

【請求項 7】 前記プラスチック基板がエポキシ系樹脂により形成されている請求項 1 ～ 6 いずれかに記載の細胞マイクロチップ。

【請求項 8】 ヘイズ値が 10 % 以下であることを特徴とする請求項 1 ～ 7 いずれかに記載の細胞マイクロチップ。

【請求項 9】 全光線透過率が 88 % 以上であることを特徴とする請求項 1 ～ 8 いずれかに記載の細胞マイクロチップ。

【請求項 10】 請求項 1 ～ 9 いずれかに記載の細胞マイクロチップを用いることを特徴とする細胞を用いた測定方法。

【請求項 11】 請求項 1 ～ 9 いずれかに記載の細胞マイクロチップを用いることを特徴とする細胞を用いた生物学的検査方法。

【請求項 12】 プラスチック基板上に流路 (A)、流路 (B)、流路 (A) と流路 (B) が合流した流路 (C)、および前記 3 つの流路によって構成される三叉路状分岐点を有するマイクロ流路が形成された細胞マイクロチップを用い

て細胞に対する薬品の作用を検査する方法であって、前記流路（A）または流路（B）のいずれか一方で培地を満たして細胞を増殖または生存させ、他方より薬品含有溶液を注入して前記細胞と前記薬品とを接触させ、前記流路（C）は前記培地もしくは溶液の通路または前記薬品の作用を検査するための領域であることを特徴とする検査方法。

【請求項 13】 前記細胞と前記薬品との接触が前記三叉路状分岐点で行われる請求項 12 に記載の薬品作用の検査方法。

【請求項 14】 細胞を増殖もしくは生存させる流路である流路（A）または流路（B）において 1 個以上の細胞から出発して細胞が直線的に単層で増殖または生存していることを特徴とする、請求項 12 または 13 に記載の薬品作用の検査方法。

【請求項 15】 前記プラスチック基板上に前記マイクロ流路が複数形成された細胞マイクロチップを用い、細胞に対する薬品の作用を複数回検査することを特徴とする請求項 12 ～ 14 いずれかに記載の薬品作用の検査方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、マイクロ流路、特に分岐路を有するマイクロ流路が形成された細胞マイクロチップ及び前記細胞マイクロチップを用いた測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、細胞を用いて薬品の作用を検査する方法としてガラスまたはプラスチックからなる皿状の培養器に細胞を相当数植え付け、培養させたあと、薬品含有溶液を添加し、細胞の生死を判断する方法が行われていた。前記方法では、事前に準備しなければならない細胞数、培地の量や試薬量は相当なものであり、細胞培養用のインキュベーター内のスペースをかなり占有する方法でもある。特に希少な細胞や試薬を使用する場合は、測定自体が困難であった。また、全細胞について観察または測定をする場合は、測定時間や判定にかなりの時間を要していた。

【0003】



一方、DNAなどの核酸や抗体などのタンパク質を多数基板上に整列させ、微小な量で反応や分析を行ういわゆるDNAマイクロチップやタンパク質マイクロチップについては、近年多数の製品が開発され（例えば、特許文献1および2を参照）、市販されているが、細胞そのものをマイクロチップ上で解析する技術は知られていない。

【0004】

【特許文献1】

特表平6-504997号公報

【特許文献2】

特表平2002-542487号公報

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、少量の細胞を用いた生物学的反応を利用して薬品の作用等の種々の測定を短期間で簡便に行うことができる細胞マイクロチップおよびそれを用いる測定方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するため鋭意検討した結果、細胞マイクロチップとして以下に示すものを用いることにより、上記目的を達成できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】

すなわち本発明は、プラスチック基板上にマイクロ流路を形成してなる細胞マイクロチップ、に関する。前記マイクロ流路の断面が矩形、三角形、円、楕円またはそれらの切断形であることが好ましい。前記マイクロ流路の断面の長辺および短辺または直径は、2～200 μm であることが好ましい。

【0007】

本発明の細胞マイクロチップは、前記マイクロ流路が1または複数の分岐点を有することが好ましい。前記分岐点は、流路（A）、流路（B）、および流路（C）によって構成される三叉路状分岐点であることが好ましい。

【0008】



また、本発明の細胞マイクロチップは、前記マイクロ流路が細胞を用いた1組の測定系を構成し、当該測定系が前記1枚のプラスチック基板上に複数形成されていることが好ましい。

【0009】

さらに、本発明の細胞マイクロチップは、前記プラスチック基板がエポキシ系樹脂により形成されていることが好ましい。また、本発明の細胞マイクロチップは、ヘイズ値が10%以下であることが好ましく、全光線透過率が88%以上であることが好ましい。

【0010】

本発明は、本発明の細胞マイクロチップを用いることを特徴とする細胞を用いた測定方法、に関する。

【0011】

本発明は、本発明の細胞マイクロチップを用いることを特徴とする細胞を用いた生物学的検査方法、に関する。

【0012】

本発明は、プラスチック基板上に流路(A)、流路(B)、流路(A)と流路(B)が合流した流路(C)、および前記3つの流路によって構成される三叉路状分岐点を有するマイクロ流路が形成された細胞マイクロチップを用いて細胞に対する薬品の作用を検査する方法であって、前記流路(A)または流路(B)のいずれか一方で培地を満たして細胞を増殖または生存させ、他方より薬品含有溶液を注入して前記細胞と前記薬品とを接触させ、前記流路(C)は前記培地もしくは溶液の通路または前記薬品の作用を検査するための領域であることを特徴とする検査方法、に関する。

【0013】

前記薬品作用の検査方法は、前記細胞と前記薬品との接触が前記三叉路状分岐点で行われることが好ましい。前記薬品作用の検査方法は、細胞を増殖もしくは生存させる流路である流路(A)または流路(B)において1個以上の細胞から出発して細胞が直線的に単層で増殖または生存していることが好ましい。

【0014】



前記薬品作用の検査方法は、前記プラスチック基板上に前記マイクロ流路が複数形成された細胞マイクロチップを用い、細胞に対する薬品の作用を複数回検査することが好ましい。

【0015】

〔作用効果〕

本発明の細胞マイクロチップによれば、プラスチック基板上に形成されたマイクロ流路中で少量の細胞を用いた生物学的反応を利用して、薬品の作用等の種々の測定を短期間で簡便に行うことができる。本発明によれば、目的に応じて様々な形状や大きさのマイクロ流路を有する細胞マイクロチップを提供することができる。前記マイクロ流路の断面の長辺および短辺または直径を、用いる細胞の大きさに応じて2～200 μm にすると、細胞を直線的に増殖または生存させることができ、まず先頭に位置する細胞の生物学的反応を測定することができる。また、前記マイクロ流路が1または複数の分岐点を有する場合、前記反応および測定箇所を分岐点付近に設定することができる。これにより、測定または測定結果の判断に要する手間と時間が短縮される。かかる効果は、前記分岐点が流路（A）、流路（B）、および流路（C）によって構成される三叉路状分岐点である場合、より有効である。

【0016】

また、本発明の細胞マイクロチップは、前記マイクロ流路が細胞を用いた1組の測定系を構成し、当該測定系が前記1枚のプラスチック基板上に複数形成されている場合、1枚のマイクロチップ上で多数の生物学反応および測定を同時に行うことができ、測定および測定結果の判断に要する手間と時間がさらに短縮される。また、細胞を培養するスペースの節約にもなり、インキュベーターを省スペースで有効に利用することができる。

【0017】

さらに、本発明の細胞マイクロチップにおいて、前記プラスチック基板がエポキシ系樹脂により形成されている場合、細胞との親和性が特に優れ、微小な空間でも細胞を良好に増殖または生存させることができ、細胞の生物学的反応を利用した測定に特に有利である。また、エポキシ系樹脂からなる基板は、透明性が良



好であって位相差が小さいという特質から細胞の顕微鏡観察に優れている。また、本発明の細胞マイクロチップは、ヘイズ値が10%以下である場合、および／または全光線透過率が88%以上である場合、透明性に優れ、細胞の顕微鏡観察や分光学的測定により適している。

【0018】

本発明の、細胞を用いた測定方法または生物学的検査方法によれば、前記細胞マイクロチップを用いることにより、短期間かつ簡便でしかも省スペースで様々な測定方法または検査方法を提供することができる。

【0019】

本発明の、細胞に対する薬品の作用を検査する方法によれば、三叉路状分岐点を有するマイクロ流路が形成された細胞マイクロチップを用いることにより薬品の作用を当該分岐点または検査用流路で調べることができ、短期間かつ簡便でしかも省スペースの検査方法を提供することができる。前記プラスチック基板上に前記マイクロ流路が複数形成された細胞マイクロチップを用いた場合、一度に多数および／または多種類の検査を実施することができる。本発明の検査方法を薬物のスクリーニング等に用いる場合、細胞を用いたハイスループットアッセイが可能であり、医薬品の開発を促進することができる。

【0020】

【発明の実施の形態】

本発明の細胞マイクロチップは、プラスチック基板上にマイクロ流路を形成してなるものである。

【0021】

本発明におけるマイクロ流路とは、プラスチック基板上に形成されたマイクロメータスケールの幅と深さを有する溝であって、細胞が存在し、液体が通過または保持される路である。また、本マイクロ流路は、1本のマイクロ流路ばかりでなく、個々のマイクロ流路（単に流路ともいう）の集合体をも包含するものである。

【0022】

前記マイクロ流路の形状は、少なくとも1個の細胞が存在し、液体が通過また



は保持される形状であれば特に制限されるものではない。前記マイクロ流路の断面は、プラスチック基板の加工の容易さや細胞の生存に適した形状という観点から、矩形、三角形、円、楕円またはそれらの切断形であることが好ましい。具体的には、四角形、V字形、半円形、U字形などがあげられる。

【0023】

前記マイクロ流路の断面の大きさは、本発明の目的、特に用いる細胞の大きさおよび断面の形状に応じて適宜設定することができる。断面が矩形、三角形またはその切断形の場合、長辺および短辺は通常 $1 \sim 1000 \mu\text{m}$ であり、 $2 \sim 200 \mu\text{m}$ であることが好ましく、 $10 \sim 100 \mu\text{m}$ がより好ましく、 $10 \sim 50 \mu\text{m}$ がさらに好ましい。断面が円、楕円またはその切断形の場合、直径は通常 $1 \sim 1000 \mu\text{m}$ であり、 $2 \sim 200 \mu\text{m}$ であることが好ましく、 $10 \sim 100 \mu\text{m}$ がより好ましく、 $10 \sim 50 \mu\text{m}$ がさらに好ましい。前記直径は、前記形状を円または楕円と仮定して算出したものであり、楕円の場合は長径および短径を示すものとする。

【0024】

前記マイクロ流路の個々の流路の長さは、本発明の目的および形成するプラスチック基板の大きさに応じて任意に設定することができ、特に制限されるものではないが、通常、 $1 \text{ mm} \sim 10 \text{ cm}$ 程度である。かかる範囲であると、取扱いが容易で種々の測定に好適に使用することができる。

【0025】

前記流路の始点および／または終点は、プラスチック基板の先端部または基板上の任意の点であり、特に制限されるものではない。流路の始点または終点が基板の先端部にある場合は、その始点または終点は最先端で開放されていてもよいし、基板の最先端から適度な長さだけ内部に位置して閉じていてもよい。流路の始点または終点が基板内部にある場合は、その始点または終点に液体をトラップするための収容部を設けてもよい。

【0026】

前記マイクロ流路は、複数の流路の集合体でもあることから、個々の流路を連結するため、当該流路が交差する 1 または複数の分岐点を有することが好ましい



。下記本発明の測定方法に適するように、前記分岐点の数は1または2以上であれば特に制限されるものではないが、1つのマイクロ流路集合体中に、2～100、好ましくは2～50、より好ましくは2～10が例示される。また、分岐点から枝別れする流路の数も、本発明の目的に合わせて2～1000、好ましくは2～500、より好ましくは2～100が例示される。前記分岐点は、マイクロ流路集合体にどのように分布していてもよく、その分布状態は、1本の流路上に適当に間隔を置いて規則的もしくは不規則的に分布する状態、複数の流路に規則的もしくは不規則に分布する状態など特に限定されるものではない。

【0027】

例えば、下記本発明の検査方法に好適に使用される細胞マイクロチップの例を図1および2に示す。図1において、細胞マイクロチップ10は、プラスチック基板1上にマイクロ流路2が形成されている。前記マイクロ流路2は、流路(A)3、流路(B)4、および流路(C)5により構成され、これら3つの流路が交差した三叉路状分岐点6を有するものである。前記流路の始点または終点は、任意に設定することができるが、図1においては、前記流路(A)および(B)の始点がプラスチック基板の先端部にある。このような構成であれば、細胞マイクロチップ10の真横から、細胞を含む試料および薬剤を含有する溶液を注入することができる。

【0028】

図1において、流路(A)3、流路(B)4、流路(C)5、および三叉路状分岐点6からなるマイクロ流路2は、例えば流路(B)4に細胞を含む試料を注入することにより1組の測定系を構成する。当該測定系は、多数の測定を効率的に同時に行うためには、1つのプラスチック基板上に複数形成されていることが好ましい。前記測定系の数は、細胞マイクロチップの大きさやマイクロ流路の加工技術によって適宜設定することができる。かかる細胞マイクロチップの例を図2に示す。

【0029】

図2において、マイクロ流路は、縦列に形成されている。また、前記測定系の一部は、さらに別の分岐点7および8を有する構成となっている。このような構



成であれば、複数の薬剤を前記測定系に別々に時差的に注入して、薬剤の相互作用を調べることができる。

【0030】

次に、本発明の細胞マイクロチップの製造方法について説明する。

【0031】

本発明の細胞マイクロチップを構成するプラスチック基板を形成する樹脂としては、熱可塑性樹脂または熱硬化性樹脂を用いることが好ましい。熱可塑性樹脂としては、ポリカーボネート、ポリアクリレート、ポリエーテルスルホン、ポリスルホン、ポリエステル、ポリメチルメタクリレート、ポリエーテルイミドやポリアミド等があげられ、熱硬化性樹脂としてはエポキシ系樹脂、不飽和ポリエステル、ポリジアリルフタレートやポリイソボニルメタクリレート等があげられる。これらの樹脂は一種または二種以上を用いることができ、他成分との共重合体や混合物などとして用いる。

【0032】

本発明においては透明性が良好であって位相差が小さく、さらには耐熱性や耐薬品性にも優れることからエポキシ系樹脂が特に好ましく用いられる。本発明においては、細胞マイクロチップに存在する細胞の状態を直接顕微鏡等で観察するため、プラスチック基板は、透明性が良好であることと位相差が小さいことが要求される。本発明の細胞マイクロチップは、細胞培養時または種々の測定時に加温することがあるので、その限度において耐熱性が要求される。また、マイクロ流路に種々の液体を通過させることから、その限度において耐薬品性が要求される。さらに、エポキシ系樹脂は、細胞のみならず、タンパク質または核酸等との親和性に優れ、細胞マイクロチップの材料としては特に好ましい。

【0033】

エポキシ系樹脂としては、例えば、ビスフェノールA型やビスフェノールF型、ビスフェノールS型やそれらの水添加の如きビスフェノール型、フェノールノボラック型やクレゾールノボラック型の如きノボラック型、トリグリシジルイソシアヌレート型やヒダントイン型の如き含窒素環型、脂環式型や脂肪族型、ナフタレン型の如き芳香族型やグリシジルエーテル型、ビフェニル型の如き低吸水性



タイプやジシクロ型、エステル型やエーテルエステル型、それらの変成型などが挙げられる。これらは単独で使用してもあるいは併用してもよい。上記各種エポキシ系樹脂の中でも、変色防止性などの点よりビスフェノールA型エポキシ樹脂、脂環式エポキシ樹脂、トリグリシジルイソシアヌレート型を用いることが好ましい。

【0034】

このようなエポキシ系樹脂としては、一般にエポキシ当量100~1000、軟化点120℃以下のものが、得られる樹脂基板の柔軟性や強度等の物性などの点より好ましく用いられる。さらに塗工性やシート状への展開性等に優れるエポキシ樹脂含有液を得る点などよりは、塗工時の温度以下、特に常温において液体状態を示す二液混合型のものが好ましく用いられる。

【0035】


またエポキシ系樹脂は、硬化剤、硬化促進剤、および必要に応じて従来から用いられている老化防止剤、変成剤、界面活性剤、染料、顔料、変色防止剤、紫外線吸収剤、有機フィラー等の従来公知の各種添加物を適宜に配合することができる。

【0036】

前記、硬化剤については特に限定はなく、エポキシ系樹脂に応じた適宜な硬化剤を1種または2種以上用いることができる。ちなみにその例としては、テトラヒドロフタル酸やメチルテトラヒドロフタル酸、ヘキサヒドロフタル酸やメチルヘキサヒドロフタル酸の如き有機酸系化合物類、エチレンジアミンやプロピレンジアミン、ジエチレントリアミンやトリエチレンテトラミン、それらのアミンアダクトやメタフェニレンジアミン、ジアミノジフェニルメタンやジアミノジフェニルスルホンの如きアミン系化合物類が挙げられる。

【0037】

またジシアンジアミドやポリアミドの如きアミド系化合物類、ジヒドラジットの如きヒドラジド系化合物類、メチルイミダゾールや2-エチル-4-メチルイミダゾール、エチルイミダゾールやイソプロピルイミダゾール、2,4-ジメチルイミダゾールやフェニルイミダゾール、ウンデシルイミダゾールやヘプタデシ



ルイミダゾール、2-フェニル-4-メチルイミダゾールの如きイミダゾール系化合物類も前記硬化剤の例として挙げられる。

【0038】

さらに、メチルイミダゾリンや2-エチル-4-メチルイミダゾリン、エチルイミダゾリンやイソプロピルイミダゾリン、2,4-ジメチルイミダゾリンやフェニルイミダゾリン、ウンデシルイミダゾリンやヘプタデシルイミダゾリン、2-フェニル-4-メチルイミダゾリンの如きイミダゾリン系化合物、その他、フェノール系化合物やユリア系化合物類、ポリスルフィド系化合物類も前記硬化剤の例として挙げられる。

【0039】

加えて、酸無水物系化合物類なども前記硬化剤の例として挙げられ、変色防止性などの点より、かかる酸無水物硬化剤が好ましく用いうる。その例としては無水フタル酸や無水マレイン酸、無水トリメリット酸や無水ピロメリット酸、無水ナジック酸や無水グルタル酸、テトラヒドロフタル酸無水物やメチルテトラヒドロフタル酸無水物、ヘキサヒドロフタル酸無水物やメチルヘキサヒドロフタル酸無水物、メチルナジック酸無水物やドデセニルコハク酸無水物、ジクロロコハク酸無水物やベンゾフェノンテトラカルボン酸無水物やクロレンジック酸無水物などが挙げられる。

【0040】

特に、無水フタル酸やテトラヒドロフタル酸無水物、ヘキサヒドロフタル酸無水物やメチルヘキサヒドロフタル酸無水物の如く無色系ないし淡黄色系で、分子量が約140～約200の酸無水物系硬化剤が好ましく用いうる。

【0041】

前記エポキシ系樹脂と硬化剤の配合割合は、硬化剤として酸無水物系硬化剤を用いる場合、エポキシ系樹脂のエポキシ基1当量に対して酸無水物当量を0.5～1.5当量となるように配合することが好ましく、さらに好ましくは0.7～1.2当量が良い。酸無水物が0.5当量未満では、硬化後の色相が悪くなり、1.5当量を超えると、耐湿性が低下する傾向がみられる。なお他の硬化剤を単独で又は2種以上を併用して使用する場合にも、その使用量は前記の当量比に準



じうる。

【0042】

前記硬化促進剤としては、第三級アミン類、イミダゾール類、第四級アンモニウム塩類、有機金属塩類、リン化合物類、尿素系化合物類等が挙げられるが、特に第三級アミン類、イミダゾール類を用いることが好ましい。これらは単独であるいは併用して使用することができる。

【0043】

前記硬化促進剤の配合量は、エポキシ系樹脂100重量部に対して0.05～7.0重量部であることが好ましく、さらに好ましくは0.2～3.0重量部がよい。硬化促進剤の配合量が0.05重量部未満では、十分な硬化促進効果が得られず、7.0重量部を超えると硬化体に変色するおそれがある。

【0044】

前記老化防止剤としては、フェノール系化合物、アミン系化合物、有機硫黄系化合物、ホスフィン系化合物等の従来公知のものが挙げられる。

【0045】

前記変成剤としては、グリコール類、シリコン類、アルコール類等従来公知のものが挙げられる。

【0046】

前記界面活性剤は、エポキシ系樹脂シートを流延法等によりエポキシ樹脂を空気に触れながら成形する場合に、シートの表面を平滑にするために添加される。界面活性剤としてはシリコン系、アクリル系、フッ素系等が挙げられるが、とくにシリコン系が好ましい。

【0047】

また、プラスチック基板は複層により形成されていてもよく、エポキシ系樹脂シート上にウレタン系樹脂、アクリル系樹脂、シリコン系樹脂等からなるハードコート層が形成されていてもよい。前記ハードコート層形成樹脂の中ではウレタン系樹脂が好ましく、ウレタンアクリレートが特に好ましく用いられる。

【0048】

本発明におけるプラスチック基板の製造は、流延法、注型法等、従来公知の方



法により形成することができる。

【0049】

注型法においては、平板金型にハードコート層形成樹脂液を塗布後、紫外線照射や加熱により硬化させる。その後、もう1枚の離型処理された平板金型を離型処理面とハードコート層が内側になるように対向配置させ、2枚の金型をスペーサー等で厚みを固定する。その後、2枚の平板金型の隙間にプラスチック基板形成樹脂液を注入し、加熱等により硬化させる。その後、2枚の金型を開くことでハードコート層が形成されたプラスチック基板を得ることができる。

【0050】

流延法においては、エンドレスベルトからなる支持体を駆動ドラムおよび従動ドラムを介し、例えば0.1～50m/分、好ましくは0.2～5m/分の一定速度で走行させつつ、その上にダイによりハードコート層形成樹脂液を塗布後、紫外線照射や加熱により硬化させ、その上にプラスチック基板形成樹脂液をダイにより塗布後、加熱等により硬化させる。その後、エンドレスベルトより剥離することによりハードコート層が形成されたプラスチック基板を得ることができる。

【0051】

プラスチック基板がエポキシ系樹脂シートとハードコート層の2層構造である場合、マイクロ流路はエポキシ系樹脂シート上に形成されていてもよいしハードコート層上に形成されていてもよいが、培養する細胞に応じて選択することができる。

【0052】

プラスチック基板がエポキシ系樹脂シートとハードコート層の2層構造である場合、表面粗さはエポキシ系樹脂シート面では0.1～5nmであることが好ましく、0.1～3nmであることがより好ましく、0.1～2nmであることが更に好ましい。ハードコート層上の表面粗さは5～100nmであることが好ましく、7～80nmであることが好ましく、10～50nmであることが更に好ましい。

【0053】



本発明の細胞マイクロチップの厚みは、 $100\mu\text{m}$ ～ $800\mu\text{m}$ であることが好ましく、 $200\mu\text{m}$ ～ $600\mu\text{m}$ であることがより好ましく、 $200\mu\text{m}$ ～ $400\mu\text{m}$ であることが更に好ましい。また、ハードコート層が形成されている場合、ハードコート層の厚みは $1\mu\text{m}$ ～ $10\mu\text{m}$ が好ましい。ハードコート層の厚みは $1\mu\text{m}$ 未満であれば十分なハードコート機能を付与することができず、 $10\mu\text{m}$ を超えるとハードコート層にひび割れが発生しやすくなる。

【0054】

本発明の細胞マイクロチップは、顕微鏡等での細胞の観察のしやすさの点から、ヘイズ値は 10% 以下であることが好ましく、より好ましくは 3% 以下、特に好ましくは $0\sim 2\%$ である。前記ヘイズ値は、JIS K 7136に準じて測定した値であり、ヘイズメーター、例えば村上色彩社製のHM-150等を用いて測定することができる。

【0055】

また、本発明の細胞マイクロチップは、顕微鏡等での細胞の観察のしやすさの点から、全光線透過率が 88% 以上であることが好ましく、より好ましくは 90% 以上、特に好ましくは $92\sim 100\%$ である。前記全光線透過率は、JIS K 7361-1に準じて測定した値であり、高速分光光度計、例えば村上色彩社製のDOC-3Cを用いて、 550nm における全透過光線を測定することにより求めることができる。

【0056】

次に、プラスチック基板上にマイクロ流路を形成させる。マイクロ流路の形成方法としては、下記レーザーを用いた加工方法があげられる。

【0057】

1. 直接加工法

(1) レーザーアブレーションによる直接エッチング加工

レーザービームのビームスキャンあるいはイメージング加工によるアブレーション加工により、直接エッチング加工して溝を形成する方法である。熱加工プロセスを経由しない非熱的加工である紫外光吸収によるアブレーション加工を用いることが、加熱時の熱的ダメージによるエッジや壁面の劣化、精度の低下、外観



の悪化を防止できるので好ましい。

【0058】

使用されるレーザーとしては、Er-YAGレーザー、Nd-YAGレーザー、Nd-YVO₄レーザー、Nd-YLFレーザー、炭酸ガスレーザー、エキシマレーザー、半導体レーザー、チタン-サファイヤレーザー、銅蒸気レーザー、自由電子レーザー、Arイオンレーザー、Krイオンレーザー、赤外の振動励起を用いた超短パルスレーザーなどがあるが、400 nm以下の紫外吸収によるアブレーションが可能なレーザー、例えば発振波長193 nmのArFエキシマレーザー、248 nmのKrFエキシマレーザーや308 nmのXeClエキシマレーザー、355 nmのNd-YAGレーザーの第3高調波、同じく266 nmの第4高調波や同じくNd-YVO₄レーザーの第3、第4高調波、あるいは400 nm以上の波長を持つレーザーであっても多光子吸収過程を経由した紫外線領域の光吸収が可能であり、波長が750 nm～850 nm付近のチタンサファイヤレーザー等で代表されるパルス幅が 1×10^{-11} 秒以下の超短パルスレーザー等が特に好適である。

【0059】

具体的な加工方法としては、例えば下記のようにすることができる。

(i) マスクイメージングあるいは、ビームホモジナイザー光学系や回折光学素子により形成する溝の幅に合わせてビーム整形したレーザー光を被加工物上に照射してアブレーション加工を行うと共に、そのレーザー照射位置を所定の加工ライン上に沿って移動させることにより溝加工を行う。

(ii) 加工形状に合わせて設計したマスクを介して被加工物上にマスクイメージング法により全体イメージを直接アブレーション加工する。

【0060】

(2) 真空プロセスによるドライエッチング

被加工物上にレジスト層または金属薄膜層を形成し、そのレジスト層または金属薄膜層に対して、通常のリソグラフィ工程により加工パターンを形成する。このパターン形成した薄膜層をマスクとして、真空プラズマ、大気圧プラズマ、反応性イオンエッチング等の真空装置によりエッチングを実施して溝を

形成する。

【0061】

(3) ウェットプロセスを使う方法

被加工物にレジスト層または金属薄膜層を形成し、そのレジスト層または金属薄膜層に対して通常のフォトリソグラフィ工程により加工パターンを形成する。このパターン形成層をマスクとして、被加工物を溶解しうるアルカリ、酸、有機溶媒等を用いてエッチングを実施し、溝を形成する。また加工物として感光性樹脂を使用した場合は、公知のフォトリソグラフィ工程により溝を形成することができる。

【0062】

2. 転写法

上記1. の(1)、(2)、(3)のいずれかの方法で所望の形状をつくり、これを母型として電鋳(エレクトロフォーミング)により型を作製する。

電鋳は、母型の表面に、蒸着や無電解めっきなどにより金属薄膜層を形成し、その後Ni, Cuといった金属の電気メッキを施して金属を厚付けしたのちに母型から剥離する。こうしてできた金属金型を用いて、プレス、スタンピング、射出成型、押し出し成型といった方法でプラスチック材料に形状を転写する。

【0063】

この方法では、最初の母型は、上記1. の(1)、(2)、(3)のいずれかの方法で加工しやすい材料を選択すればよい。転写法は、一旦型を作れば量産しやすいという利点がある。一方で、製品の材質は、スタンピングや射出成型等ができる材料であることを必要とする。

【0064】

以上、レーザーを用いてマイクロ流路を加工する場合、流路の幅や長さは、マスクに所望の形状を設計することにより設定できる。流路の深さや断面の形状は、照射するレーザー量を適宜調整することによって設定することができる。

【0065】

マイクロ流路を加工する場合、プラスチック基板を構成する樹脂に紫外線吸収剤や有機フィラーを含有させることにより、レーザーの吸収を高めることができ



る。

【0066】

本発明の細胞マイクロチップは、マイクロ流路内の液体の蒸発を防ぐため、当該チップの上面にプラスチック製の蓋をかぶせて使用することができる。このような蓋としては、少なくともマイクロ流路全体を覆う形状と面積を有するものであって、その厚さは30～400 μm 程度のものであればよい。前記プラスチックの材質は、前記基板と同様のものが用いられる。あるいは、細胞マイクロチップを2段以上重ねて用いる場合は、真上に位置するマイクロチップの底面を真下に位置するマイクロチップの蓋の代替品とすることができる。

【0067】


このようにして製造された本発明の細胞マイクロチップは、細胞を用いた測定方法に使用することができ、本発明は、当該細胞マイクロチップを用いる測定方法を提供する。

【0068】

また、本発明は、当該細胞マイクロチップを用いることを特徴とする細胞を用いた生物学的検査方法を提供する。

【0069】

本発明で使用する細胞は、特に制限されるものではない。当該細胞は、細菌、真菌（酵母を含む）、植物細胞および動物細胞があげられ、マイクロ流路の大きさに適合する限り原生動物（原虫）も含まれる。なかでも、種々の測定法に汎用される動物細胞が好適に使用される。動物細胞としては、各種動物の組織から単離された細胞、継代細胞、株化細胞、さらには生殖細胞（卵子または精子）、胚性幹細胞、体性幹細胞、神経細胞などがあげられる。ヒトの疾患の診断、予防または治療に役立つ測定方法に使用するためには、ヒト由来の細胞が好ましく、例えば、癌その他の疾患に罹患した患者の病理組織由来の細胞があげられる。患者の病理組織由来の細胞を使用する場合は、同一人の正常な組織由来の細胞または健常人の正常な組織由来の細胞を対照として使用することが好ましい。これらの細胞は、マイクロ流路の底面に付着して増殖または生存する細胞であってもよく、浮遊状態で増殖または生存する細胞であってもよく、未分化な細胞であっても



よく、分化した細胞であってもよい。また、通常の遺伝子導入用細胞は公的寄託機関から入手することができ、好ましい。そのような細胞としては、COP、L、C127、Sp2/0、NS-1、NIH3T3、ST2等のマウスまたはラット由来細胞、BHK、CHO等のハムスター由来細胞、COS1、COS3、COS7、CV1、Vero等のサル由来細胞、HeLa、293等のヒト由来細胞、およびSf9、Sf21、High Five等の昆虫由来細胞などが例示される。本発明の細胞マイクロチップにおいては、細胞だけではなく、タンパク質や核酸も存在していてもよい。

【0070】

前記細胞は、細胞に適した培地および環境下で、細胞マイクロチップ中で培養することができる。特にプラスチック基板がエポキシ系樹脂であると、細胞との親和性が高く、好都合である。前記細胞を培養することにより、マイクロ流路に沿って単層で増殖させることもできる。


【0071】

例えば、細胞マイクロチップ中で哺乳動物細胞を培養する方法は、細胞培養用インキュベーター（37℃、加湿下で、5%CO₂存在下）内で、血清を補足した市販の培地中で、培養することができる。この場合、マイクロ流路内に細胞を導入するには、例えばマイクロピペットやマイクロシリンジを用いて、流路の始点の真上または真横から細胞含有培地を注入すればよい。培養中の培地交換は、マイクロ流路中の一部の培地をマイクロピペットやマイクロシリンジを用いて排出し、その後に新鮮な培地を補う方法、または培養期間中はマイクロポンプ等で低速で培地を流す方法があげられる。あるいは、マイクロチップを格納できる大きさの培養皿に培地を満たし、その中にマイクロチップ全体を浸して培養する浸漬法の場合は、培地を交換する必要はない。

【0072】

本発明における培地には、前記したような細胞を培養するために使用する通常の培地のみならず、無血清培地や細胞の一時的生存のために使用する生理食塩水、リン酸緩衝液などの溶液も含まれる。

【0073】



以下に、図 1 に示す細胞マイクロチップを用いて、細胞に対する薬品の作用を検査する方法について説明する。

プラスチック基板上 1 に流路 (A) 3、流路 (B) 4、流路 (A) と流路 (B) が合流した流路 (C) 5、および前記 3 つの流路によって構成される三叉路状分岐点 6 を有するマイクロ流路 2 が形成された細胞マイクロチップを用いて細胞に対する薬品の作用を検査する方法において、前記流路 (A) 3 または流路 (B) 4 のいずれか一方で培地を満たして細胞を増殖または生存させ、他方より薬品含有溶液を注入し、前記細胞と前記薬品とを接触させる。


【0074】

流路 (A) 3 または流路 (B) 4 での細胞の培養は、前述のように行う。使用する細胞は、1 つ以上の細胞から出発して当該流路で直線的に単層で増殖または生存している細胞が好ましい。前記細胞を、他方の流路から注入した薬品含有溶液と接触させる。薬品含有溶液の注入方法は、例えばマイクロピペットやマイクロシリンジを用いて、流路の始点の真上もしくは真横から注入する方法またはマイクロポンプ等で低速で溶液を流す方法があげられる。この場合、薬品含有溶液は、細胞培養用培地に所定濃度の薬品を含有させたものが好ましい。前記接触は、最先端の 1 個の細胞と溶液との接触が好ましく、その接点は三叉路状分岐点 6 であることが好ましい。培地や薬品含有溶液は、流路 (C) 5 の方向に流れ、最終的には当該測定系から排出される。

【0075】

また、マイクロ流路が複数形成された図 2 に示すような細胞マイクロチップを用いた場合、1 枚のチップを用いて細胞に対する薬品の作用を複数回検査することが可能であり好ましい。この場合、同種の細胞を用いて検体数 (n k 数) を増やすことができるし、同種の細胞を用いて多数の種類および濃度の薬品について薬品の作用を同時に検査することもできるし、異種の細胞に対する 1 種類の薬品の作用の比較を同時に検査することもできる。また、異種の細胞を用いる場合、陰性のコントロール細胞および／または陽性のコントロール細胞を対照として用いることが好ましい。

【0076】



細胞に対する薬品の作用の判断は、例えば、細胞の耐薬品性を検査する場合、耐薬品性のない細胞は分岐点 6 付近で増殖が止まることになる。また耐薬品性がある細胞は、流路 (C) 5 を増殖路として増殖を続けることになる。

【0077】

細胞の増殖が止まった場合、細胞の生死は顕微鏡等で観察して判断する。この場合、流路 (A) 3 と流路 (B) 4 の分岐点付近の薬品含有溶液と接触した 1 個の細胞のみを観察すればいいので、判断に要する時間は短くなる。

【0078】


薬品含有溶液の薬品濃度は、薬品含有溶液を細胞に接触させた後も高く変えることができることが本発明の特徴である。具体的には流路 (A) 3 から薬品含有溶液を注入した場合、流路 (A) 3 に流れる支流を加工し、その支流から高濃度の薬品溶液を注入することにより、細胞と接触する薬品含有溶液の薬品濃度を高くすることができる。細胞と接触する薬品の濃度は、レーザー比色法で予め検量線を作成しておき、分岐点 6 付近の薬品含有溶液をレーザー比色法により測定することによって求めることができる。

【0079】

このように、細胞に接触させた後も薬品含有溶液の薬品濃度を連続的に高くすることができるので、三叉路状マイクロ流路を用いて再度細胞を増殖させ、濃度の高い薬品含有溶液を再度注入するという必要がなく効率的である。これにより、測定対象の細胞の耐薬品性などの閾値を容易に決定することができる。以上のように薬品含有溶液の薬品濃度を適宜変更できることにより、1 組の測定系中で濃度の異なる薬品含有溶液を同一対象の細胞に接触させ、時系列的に検査することが可能になる。1 組の測定系で濃度の異なる薬品含有溶液を細胞に接触させる場合、濃度の低い薬品含有溶液から始めて段階的に濃度を上げていくことが、薬品含有溶液の濃度の正確性と細胞生理学的観点から好ましい。

【0080】

前記本発明の検査方法に用いられるマイクロ流路は、三叉路状分岐点を有するマイクロ流路に限定されるものではなく、3 以上の流路が一本の流路に合流している分岐点を有するものでもよい。この場合、各流路の幅は同じであることが好



ましい。例えば流路 (A)、(B)、(C) が合流して流路 (D) になっているような形状の場合、流路 (A)、(B)、(C) に異なった種類の細胞を増殖させ、流路 (A)、(B)、(C) の交点で 3 種類の細胞を接触させた場合、これら細胞間の相互作用により発生するシグナルを検出することができる。かかるシグナルとしては特に限定されるものではないが、リガンド、サイトカイン、成長因子、細胞膜上の電位の変化などがあげられる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の細胞マイクロチップの一態様を示す模式図

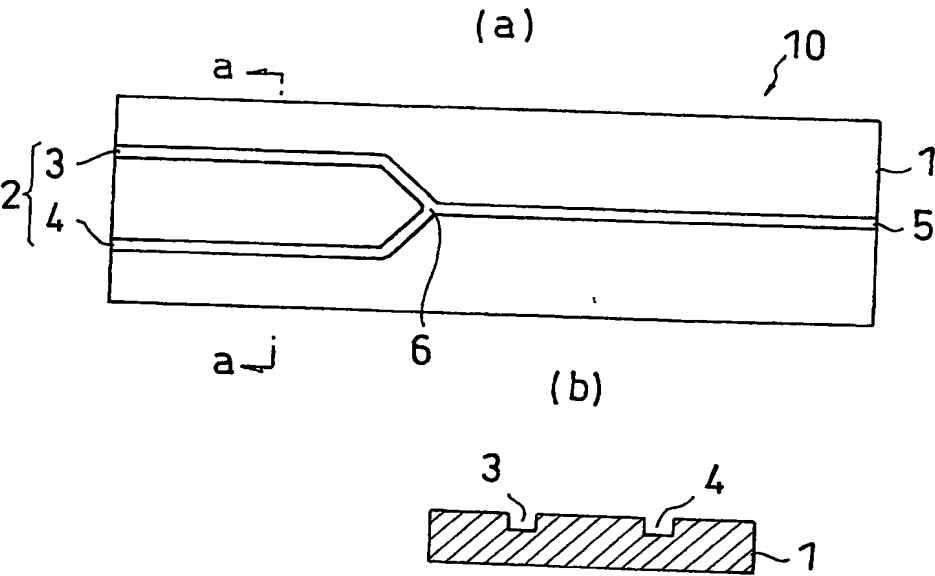
【図 2】

本発明の細胞マイクロチップの別の態様を示す模式図

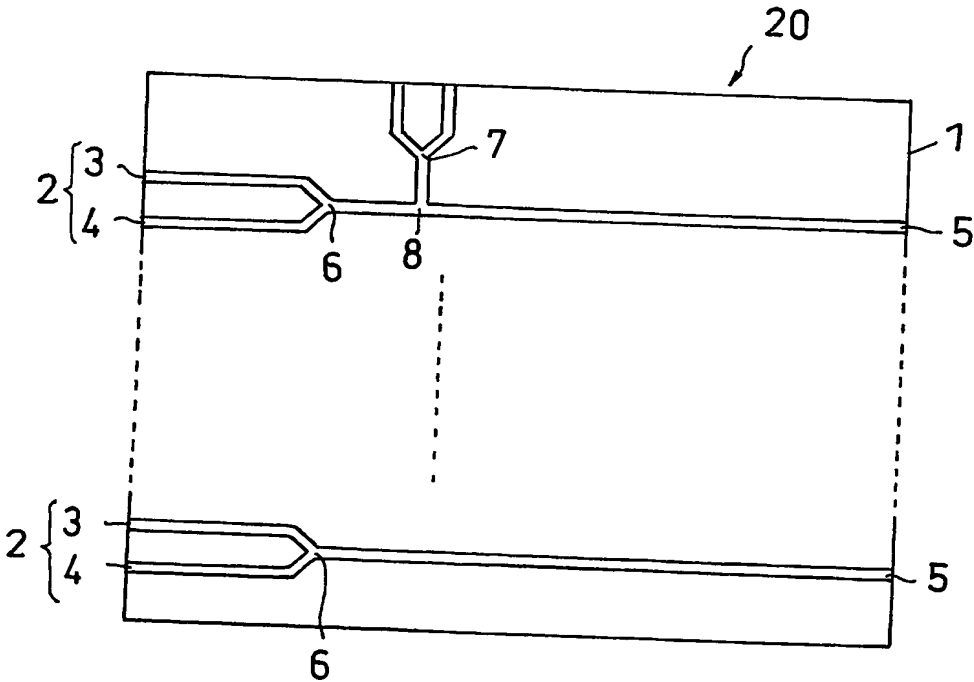
【符号の説明】

- 1 プラスチック基板
- 2 マイクロ流路
- 3 流路 (A)
- 4 流路 (B)
- 5 流路 (C)
- 6 三叉路状分岐点
- 7 三叉路状分岐点
- 8 三叉路状分岐点
- 10 細胞マイクロチップ
- 20 細胞マイクロチップ

【書類名】 図面
【図 1】



【図 2】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 少量の細胞を用いた生物学的反応を利用して薬品の作用等の種々の測定を短期間で簡便に行うことができる細胞マイクロチップおよびそれを用いる測定方法を提供する。

【解決手段】 プラスチック基板上にマイクロ流路を形成してなる細胞マイクロチップ、ならびに前記細胞マイクロチップを用いることを特徴とする細胞を用いた測定方法、および前記細胞マイクロチップを用いることを特徴とする細胞を用いた生物学的検査方法。

【選択図】 図 1

特願 2003-176365

ページ: 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[000003964]

1. 変更年月日

[変更理由]

住所

氏名

1990年 8月31日

新規登録

大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号

日東電工株式会社